

**ENZYMHISTOCHEMISCHE UND
AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN DER MIT N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL)-
NITROSAMIN CANCERISIERTEN HARNBLASE
DER RATTE**

Gottfried Krüsmann

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Eder

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND AUTORADIOGRAPHISCHE UNTER-
SUCHUNGEN AN DER MIT N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL)-
NITROSAMIN CANCERISIERTEN HARNBLASE DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

GOTTFRIED KRÜSMANN

aus

Lochham

1976

Mit Genehmigung des FB Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODIK	2
1. Versuchsanordnung	2
2. Auswertung der autoradiographischen Befunde	3
III. ERGEBNISSE	5
1. Morphologische Befunde	5
2. Enzymhistochemische Befunde	5
a) Alkalische Phosphatase	5
b) NADH-Diaphorase	10
3. Autoradiographische Befunde	12
IV. DISKUSSION	17
V. ZUSAMMENFASSUNG	23
VI. LITERATURVERZEICHNIS	25

I. EINLEITUNG

Enzymhistochemische Untersuchungen während der Induktion von Harnblasentumoren bei der Ratte mit Di-N-Butyl-Nitrosamin ergaben irreversible präneoplastische Enzymausfallsbezirke der alkalischen Phosphatase an lichtoptisch unauffälligem, nicht hyperplastischem Urothel (KUNZE, SCHAUER und CALVOER 1969; KUNZE und SCHAUER 1971; KUNZE, SCHAUER und SPIELMANN 1971). In einem hohen Prozentsatz war gleichzeitig in identischen Bezirken zusätzlich die Aktivität der NADH-Diaphorase stark abgeschwächt. Auch nach Applikation von N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl]Formamid, einem chemisch völlig anders strukturiertem, harnblasenspezifischen Cancerogen, traten derartige Enzymausfallsbezirke auf (KUNZE, SCHAUER und KRÜSMANN 1975). Kombinierte enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen mit tritiiertem Thymidin zeigten in den Ausfallsbezirken der alkalischen Phosphatase eine gegenüber dem umgebenden, enzymhaltigen Urothel stark erhöhte Proliferationsaktivität (KUNZE und SCHAUER 1971). Die vollentwickelten Harnblasentumoren unterschiedlicher Dignität, die sich aus den Urothelabschnitten mit Enzymverlust über verschiedene Stadien der Hyperplasie entwickelten, wiesen in der weit überwiegenden Mehrzahl der Fälle ebenfalls einen Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase in nahezu allen Bereichen auf. Ferner konnte sehr häufig auch eine herdförmig begrenzte starke Aktivitätsabschwächung der NADH-Diaphorase in den Tumoren festgestellt werden.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, festzustellen, ob analoge präneoplastische Ausfallsbezirke der alkalischen Phosphatase auch nach Verabreichung von N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin, einem hochwirksamen Harnblasencancerogen, das erstmals von DRUCKREY und Mitarbeitern (1964)

synthetisiert wurde, auftreten. Ferner sollten weitere detaillierte Informationen über das Proliferationsverhalten der Urothelzellen in den Enzymdefektbezirken erarbeitet werden; dabei interessierte vor allem die Frage, in welchem Ausmaß die Basalzellen bzw. die suprabasal gelegenen Zellen an der Proliferationsaktivität beteiligt sind.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Versuchsanordnung

25 weiblichen und 13 männlichen Sprague-Dawley Ratten (Ausgangsgewicht: 180-200 g) wurde N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin (BBN; chemische Fabrik Dr. Theodor Schuchardt, München) in einer Dosierung von 20 mg/kg/die 50-150 Tage lang im Trinkwasser verabreicht. Alle Versuchstiere wurden in Makrolonkäfigen gehalten und erhielten standardisiertes Pressfutter (Altromin). Um möglichst viele verschiedene Stadien der Cancerogenese zu erfassen, wurden die Tiere zeitlich gestaffelt vom 150. bis zum 350. Versuchstag getötet. Um die Irreversibilität der gefundenen Veränderungen zu prüfen, wurden die Ratten 100-240 Tage vor der Tötung von der Cancerogenezufuhr abgesetzt.

Für autoradiographische Untersuchungen wurde allen Tieren eine Stunde vor Tötung (Tötung jeweils um 9.15 Uhr) 6-³H-Thymidin (The Radiochemical Centre Amersham, England; spez. Aktivität: 5,0 Ci/mMol) in einer Dosierung von 0,3 mCi/100 g intraperitoneal injiziert. 10 unbehandelte Sprague-Dawley Ratten dienten als Kontrollen und erhielten die gleiche Dosierung von 6-³H-Thymidin.

Für enzymhistochemische Untersuchungen wurden von jeder Harnblase mindestens 80 $5\ \mu$ dicke Kryostatserienschnitte hergestellt, wobei jeweils ein Schnitt für die Reaktion der alkalischen Phosphatase (STUTTE 1967: Inkubationslösung A: 20 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8; 5,0 mg Naphthol-ASBI-phosphat; 0,2 ml Dimethylformamid; Inkubationslösung B: 0,1 ml 4 %iges Natriumnitrit; 0,1 ml 4 %iges basisches Neufuchsin; Inkubationszeit nach Mischen von Lösung A und B bei 37° C: 15 Minuten) und der nächste für die Reaktion der NADH-Diaphorase (SCARPELLI, HESS und PEARSE 1958: Inkubationslösung A: 2 mg NADH in 0,5 ml Aqua bidest.; Inkubationslösung B: 1,25 ml 0,2 %iges NBT in wässriger Lösung; 0,5 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,3; 0,4 ml Ringerlösung; Inkubationszeit nach Mischen von Lösung A und B: 30 Minuten bei Zimmertemperatur) vorbereitet wurde. Zur Herstellung der Autoradiogramme wurden die Schnitte, an denen die Reaktion der alkalischen Phosphatase abgelaufen war, mit Stripping-Film Kodak AR 10 überzogen. Die photographische Expositionszeit betrug 14 Tage. Danach wurden die Autoradiogramme entwickelt und fixiert (Zusammensetzung der Entwicklerlösung: 7,2 g Natriumsulfit; 3,2 ml 10 %iges Kaliumbromid; 1,8 g Amidol; 400 ml Aqua bidest.; Dauer der Entwicklung: 12 Minuten; Zusammensetzung des Fixierbades: 150 g Natriumthiosulfat; 10 g Kaliummetabisulfit; 500 ml Aqua bidest.; Dauer der Fixierung: 25-30 Minuten).

2. Auswertung der autoradiographischen Befunde

In den Urothelabschnitten mit Verlust der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde der 6-³H-Thymidin-Markierungsindex in % (³H-TdR-Index) bestimmt. Zum Vergleich wurde der ³H-TdR-Index auch im enzymhaltigen Urothel des gleichen Schnittes sowie bei Kontrolltieren bestimmt. Die Auswertungen wurden differenziert für die Basalzell-

schicht und die suprabasalen Zellschichten durchgeführt. Die Einteilung des Urothels in Basalzellschicht und suprabasale Zellschicht erscheint für die Erhebung autoradiographischer Befunde sinnvoll, da die Zellkerne des Urothels schichtweise angeordnet sind und die basal gelegenen Zellen normalerweise eine wesentlich höhere Proliferationsaktivität als die suprabasalen Zellen aufweisen. Eine derartige Unterteilung ist jedoch problematisch, da, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen (PETRY und AMON 1966) gezeigt haben, die suprabasalen Zellen durch Cytoplasmafortsätze mit der Basalmembran verbunden sind und das Urothel demnach einen einschichtigen, mehrreihigen Zellverband darstellt. Andere Untersucher (WALKER 1960; HICKS 1966; KOSS 1969; CLAYSON und COOPER 1970) konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigen. Die Zellzählungen in den Enzymausfallsbezirken erfolgten jeweils an 2-5 Schnitten. Zum Vergleich wurden im enzymhaltigen Urothel der gleichen Schnitte jeweils 7000-8000 Zellen und im Urothel der Kontrolltiere jeweils 15000-20000 Zellen pro Tier ausgewertet.

Da die Papillome in der weit überwiegenden Mehrzahl einen völligen Verlust der alkalischen Phosphatase, jedoch nur herdförmige Aktivitätsabschwächungen der NADH-Diaphorase zeigten, wurde der ^3H -TdR-Index der Papillome in Bezirken mit erhaltener Aktivität der NADH-Diaphorase sowie in Arealen mit Enzymabschwächung getrennt bestimmt. Auch im normal erscheinenden, die Papillome umgebenden Urothel, wurden jeweils 7000-8000 Zellen zum Vergleich ausgewertet.

III. ERGEBNISSE

1. Morphologische Befunde

Als früheste, lichtmikroskopisch erkennbare histologische Veränderung des Urothels während der Cancerogenese traten umschriebene Hyperplasien auf, die sich aus morphologisch unauffälligen Urothelzellen zusammensetzten. Gelegentlich fanden sich Hyperplasien mit Plattenepithelmetaplasie und beginnender Verhornung. Alle Übergänge von Hyperplasien bis zu voll entwickelten Tumoren konnten beobachtet werden. Bei 37 von 38 Versuchstieren traten Tumoren unterschiedlicher Dignität auf. 16 Tiere wiesen ausschließlich Papillome, 7 Tiere ausschließlich Carcinome auf. Bei 14 Ratten wurden gleichzeitig Papillome und Carcinome beobachtet. Mit wachsender Gesamtversuchsdauer (Induktionszeit und Expositionszeit) nahm die Anzahl der Carcinome zu. Die Carcinome teilten sich in 12 Transitionalzellcarcinome, 1 Plattenepithelcarcinom, 7 Mischtypen aus Transitionalzell- und Plattenepithelcarcinom und 1 undifferenziertes Carcinom auf. Fernmetastasen konnten in keinem Falle gefunden werden.

2. Enzymhistochemische Befunde

a. Alkalische Phosphatase

Das normale Urothel der Ratte zeigt enzymhistochemisch eine starke Reaktion der alkalischen Phosphatase (GOMORI 1941; MENDE und CHAMBERS 1957; MARTIN 1958; KUNZE und SCHAUER 1971; STILLER und RAUSCHER 1971). Regelmäßig weisen die basal und intermediär gelegenen Zellschichten eine hohe Intensität der Reaktionsniederschläge auf, während in den apikalen Anteilen der Superfizialzellen meist

keine alkalische Phosphatase nachweisbar ist. Oft zeigt sich die stärkste Aktivität des Enzyms kappenförmig in den apikalen Cytoplasmaanteilen der Basal- und Intermediärzellen. Anderen Autoren (MENDE und CHAMBERS 1957) fanden in den Superfizialzellen keine alkalische Phosphatase, während in der vorliegenden Untersuchung nur selten ganze Superfizialzellverbände ohne Enzymreaktion beobachtet werden konnten. Aus dem Zellverband herausgelöste Superfizialzellen reagierten stets negativ.

Während der Cancerogenese wurden vor Auftreten von Hyperplasien an normal breitem Urothel herdförmige, scharf begrenzte Abschnitte mit totalem Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase gefunden (Abb. 1). Die Urothelzellen in diesen Bereichen waren stets lichtmikroskopisch unauffällig und von den angrenzenden, enzymhaltigen Urothelzellen nicht zu unterscheiden. Nur selten fanden sich vereinzelte Zellen in diesen Bezirken, die eine positive Enzymreaktion aufwiesen. Mehrmals konnten Urothelabschnitte gefunden werden, in denen die oberflächlich gelegenen Zellen noch enzymhaltig waren, während die Basalzellen und die tiefer gelegenen Intermediärzellen bereits kein Enzym mehr nachweisen ließen. Bei Tieren, die das Cancerogen über einen längeren Zeitraum erhalten hatten, wurden oft mehrere Enzymausfallsbezirke an verschiedenen Stellen der gleichen Harnblase gefunden. Der Enzymdefekt in diesen Bezirken ist nicht toxisch bedingt, da er noch nach einer Absetzungszeit des Cancerogens von 8 Monaten nachweisbar war.

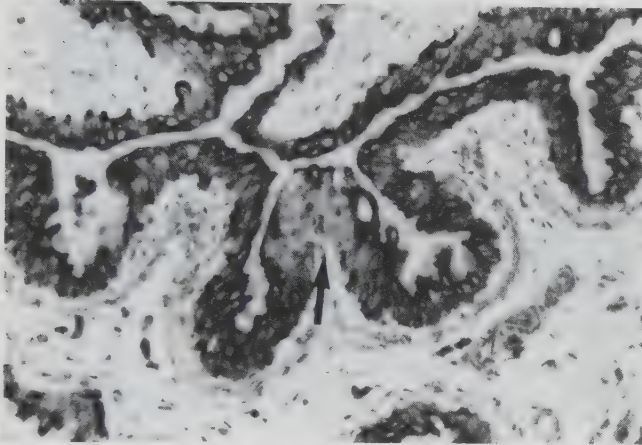


Abb. 1: Umschriebener Urothelabschnitt mit weitgehendem Verlust der alkalischen Phosphatase (siehe Pfeil). Erhaltene Enzymaktivität (schwarz) in einzelnen Superficialzellen sowie in der umgebenden Harnblasenschleimhaut.

Expositionszeit:	70 Tage
Gesamtversuchsdauer:	215 Tage
Vergrößerung:	75-fach

Einen Verlust der alkalischen Phosphatase zeigten auch die unterschiedlich stark ausgeprägten Hyperplasien. Selten wurden allerdings auch Hyperplasien mit erhaltener Enzymaktivität gefunden. Die Papillome wiesen in der überwiegenden Mehrheit in allen Bereichen einen Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase auf (Abb. 2). Manchmal traten Papillome auf, welche neben Abschnitten mit Verlust der alkalischen Phosphatase auch Tumorbezirke mit erhaltener Enzymaktivität zeigten. Ganz selten war in Papillomen mit Übergangsepitheldifferenzierung die Aktivität der alkalischen Phosphatase wie im normalen Urothel unverändert stark vor-

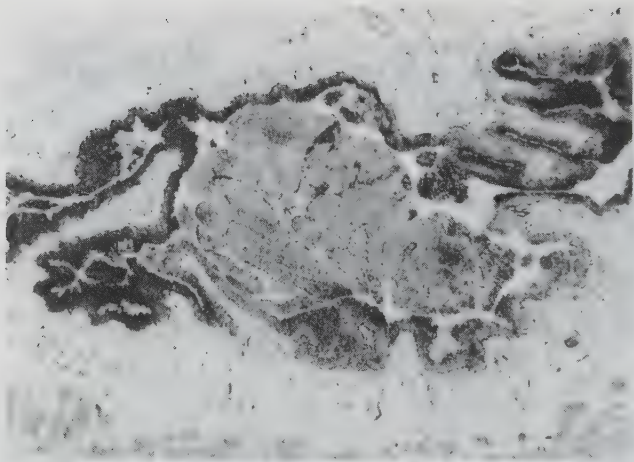


Abb. 2: Papillom mit fast vollständigem Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase.

Expositionszeit:	55 Tage
Gesamtversuchsdauer:	290 Tage
Vergrößerung:	30-fach

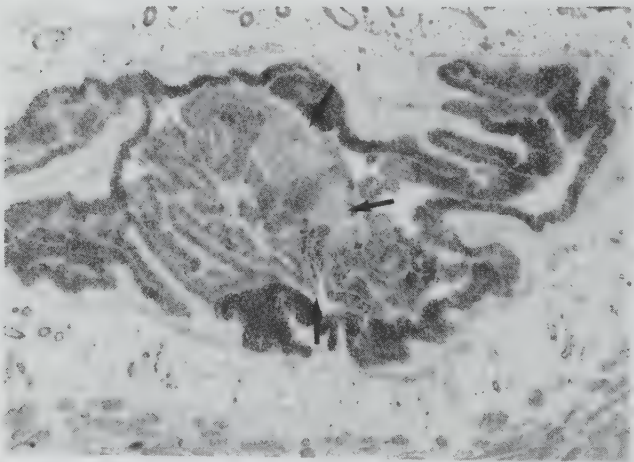


Abb. 3: Gleiches Papillom wie in Abb. 2. Aktivität der NADH-Diaphorase in den meisten Teilen des Tumors unverändert stark erhalten. Enzymaktivität nur in umschriebenen Bezirken abgeschwächt (obere Pfeile). Erhöhte Enzymaktivität in Teilbezirken (unterer Pfeil)

handen. Papillome mit Plattenepithelmetaplasie zeigten stets einen totalen Verlust der alkalischen Phosphatase.

Die Transitionalzellcarcinome wiesen grundsätzlich das gleiche Aktivitätsverhalten der alkalischen Phosphatase wie die Papillome auf. Die größte Anzahl von ihnen zeigte einen totalen Verlust des Enzyms (Abb. 4), nur gelegentlich war die Enzymaktivität in Teilstrukturen erhalten. In den beobachteten Plattenepithelcarcinomen war wie in den Plattenepithelpapillomen die Enzymaktivität stets ausgefallen.

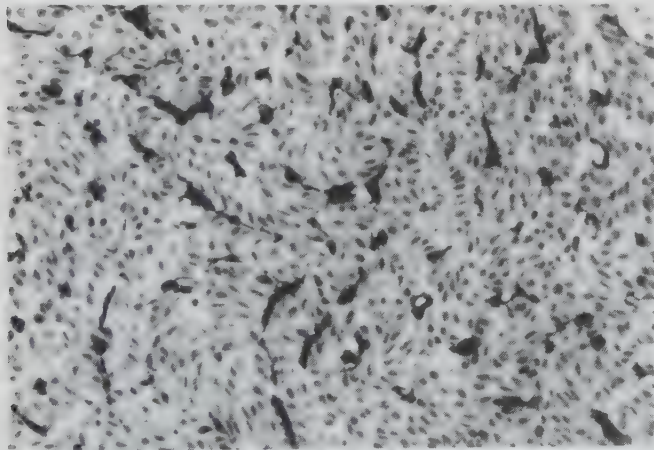


Abb. 4: Gut differenziertes Transitionalzellcarcinom mit totalem Verlust der Aktivität der alkalischen Phosphatase; positive Enzymreaktion (schwarz) an den Kapillaren.

Expositionszeit:	150 Tage
Gesamtversuchsdauer:	350 Tage
Vergrößerung:	190-fach

b. NADH-Diaphorase

Das normale Urothel wies eine etwa gleichmäßig starke Aktivität der NADH-Diaphorase in allen Zellschichten auf. Während der Cancerogenese zeigten die Urothelabschnitte mit Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase in etwa 2/3 der Fälle eine unterschiedlich starke Abschwächung der Aktivität der NADH-Diaphorase. Einfache und papilläre Hyperplasien zeigten das gleiche Enzymverhalten. Selten waren Hyperplasien mit unvermindert starker Reaktion der NADH-Diaphorase zu sehen.

In den Papillomen verhielt sich die Aktivität der NADH-Diaphorase sehr unterschiedlich (Abb. 3 und 5). Meist war sie nur in Teilbereichen des Tumor stark

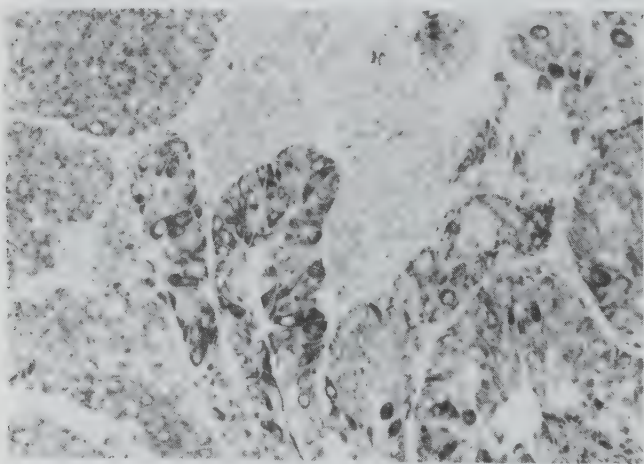


Abb. 5: Ausschnitt von Abb. 3 (unterer Pfeil in Abb. 3). Neben Bezirken mit abgeschwächter Aktivität der NADH-Diaphorase (Bildmitte oben) solche mit erhaltener Enzymaktivität.

Vergrößerung:

190-fach

abgeschwächt oder nahezu negativ, seltener betraf der Aktivitätsverlust das gesamte Papillom. Es fanden sich auch einige Papillome mit vollständig erhaltener Aktivität. Gelegentlich konnte in kleinen Zellbezirken auch eine Aktivitätserhöhung der NADH-Diaphorase nachgewiesen werden. Abschnitte von Transitionalzellpapillomen mit einer Plattenepithelmetaplasie zeigten einen totalen Verlust des Enzyms.

In den meisten Transitionalzellcarcinomen verhielt sich die NADH-Diaphorase wie in Papillomen. Die Aktivität des Enzyms war in umschriebenen Arealen stark abgeschwächt, in großen Teilen des Tumors jedoch unverändert stark erhalten (Abb. 6). Plattenepithelcar-

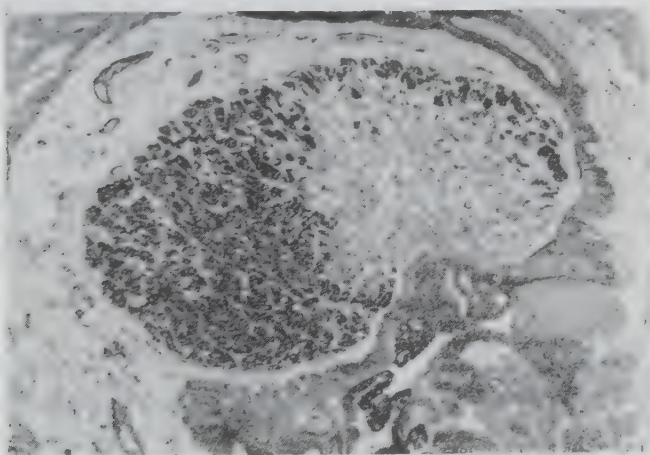


Abb. 6: Transitionalzellcarcinom mit herdförmig stark abgeschwächter Aktivität der NADH-Diaphorase

Expositionszeit:	90 Tage
Gesamtversuchsdauer:	270 Tage
Vergrößerung:	30-fach

cinome zeichneten sich durch regelmäßigen, fast vollständigen Enzymverlust in allen Tumorbezirken aus (Abb. 7).

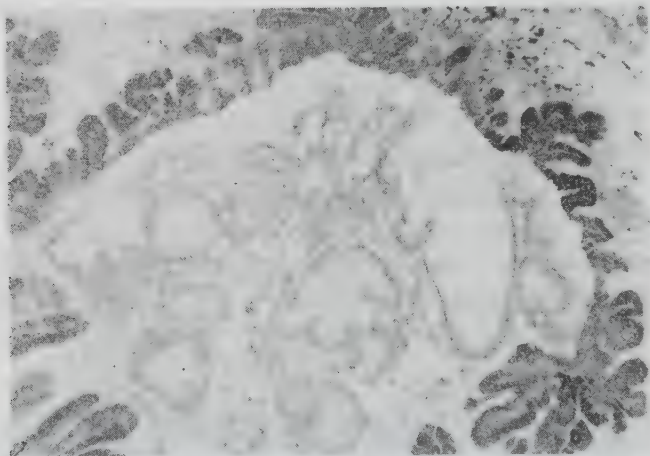


Abb. 7: Verhorntes Plattenepithelcarcinom mit stark abgeschwächter Aktivität der NADH-Diaphorase. Positive Enzymreaktion im meist hyperplastischen Urothel der Umgebung.

Expositionszeit:	115 Tage
Gesamtversuchsdauer:	135 Tage
Vergrößerung:	30-fach

3. Autoradiographische Befunde

Das Urothel der Ratte zeigt normalerweise eine sehr langsame physiologische Regeneration. Die quantitativen autoradiographischen Untersuchungen an 10 unbehandelten Ratten ergaben am Gesamtturothel einen durchschnittlichen $^3\text{H-TdR}$ -Index von 0,26 % (Tab. 1). Die Werte der Einzeltiere schwankten zwischen 0,13 % und 0,54 %. Im Einzelnen wiesen die Basalzellschicht einen $^3\text{H-TdR}$ -Index von 0,49 % und die suprabasal geleg-

nen Zellen von 0,04 % auf (Tab. 1).

Tier Nr.	Gesamturothel	Basale Zellen	Suprabasale Zellen
1	0,44 $\pm$ 0,22	0,97 $\pm$ 0,40	0,12 $\pm$ 0,22
2	0,25 $\pm$ 0,34	0,51 $\pm$ 0,69	0,00
3	0,21 $\pm$ 0,22	0,47 $\pm$ 0,67	0,05 $\pm$ 0,17
4	0,17 $\pm$ 0,28	0,30 $\pm$ 0,57	0,06 $\pm$ 0,14
5	0,13 $\pm$ 0,15	0,23 $\pm$ 0,23	0,05 $\pm$ 0,13
6	0,15 $\pm$ 0,17	0,37 $\pm$ 0,34	0,03 $\pm$ 0,06
7	0,38 $\pm$ 0,48	0,79 $\pm$ 1,09	0,12 $\pm$ 0,21
8	0,15 $\pm$ 0,18	0,32 $\pm$ 0,31	0,00
9	0,54 $\pm$ 0,30	0,21 $\pm$ 0,43	0,39 $\pm$ 0,23
10	0,13 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,15	0,08 $\pm$ 0,16
Mittelwert:	0,26	0,49	0,09

Tab. 1: ^3H -TdR-Index (%) des Urothels von Kontrolltieren bezogen auf das gesamte Urothel, die Basalzellschicht und die suprabasalen Zellen (Mittelwerte mit Standardabweichung).

80,9 % aller DNS-synthetisierenden Zellen lagen in der basal gelegenen Zellschicht. Bezogen auf die verschiedenen Regionen der Harnblase war die Wachstumstendenz im Bereich der Ureterostien am größten.

Im Gegensatz zum relativ stabilen Proliferationsverhalten des Urothels unter physiologischen Bedingungen wurde während des Cancerisierungsvorganges in den Schleimhautabschnitten mit Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase eine starke Zunahme der Proliferationsaktivität gefunden. Der ^3H -TdR-Index in diesen Bereichen betrug, auf alle Zellschichten bezogen, durchschnittlich 8,1 %. Verglichen mit dem enzymhaltigen Urothel der gleichen Schnitte (Abb. 8) fand sich in diesen Bezirken eine 43-fache Zunahme des ^3H -TdR-Index. Auch hier war der Index

der Basalzellschicht mit 17,3 % am größten. Die suprabasalen Zellen zeigten einen durchschnittlichen ^3H -TdR-Index von 3,7 %. In den proliferationsaktiven Bezirken wurden also die suprabasalen Zellschichten wesentlich stärker als im normalen Urothel an der DNS-Synthese beteiligt. Während im Urothel von Kontrolltieren nur

Versuchsdauer (Tage)	Gesamturothel	Basalzellschicht	Suprabasale Zellen
135	13,7	20,0	9,0
135	11,4	22,0	6,3
135	2,7	10,0	0,8
145	12,9	25,5	4,0
150	8,1	12,5	5,5
150	9,6	24,7	2,2
200	3,5	8,6	0,3
215	3,8	10,2	0,0
215	6,4	15,2	3,1
275	8,0	24,2	3,7
275	8,8	22,0	3,9
275	5,8	17,2	0,5
290	5,0	2,5	5,9
290	14,0	28,0	6,5
Mittelwert:	8,1	17,3	3,7

Tab. 2: ^3H -TdR-Index in nicht hyperplastischen Urothelabschnitten mit Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase, bezogen auf das Gesamturothel, auf die Basalzellschicht und die suprabasalen Zellen.

19,1 % der suprabasalen Zellen markiert waren, fanden sich in den Enzymdefektbezirken 31,9 % aller DNS-synthetisierender Zellen suprabasal. Der Unterschied war signifikant (Student Test; $p < 0,05$).

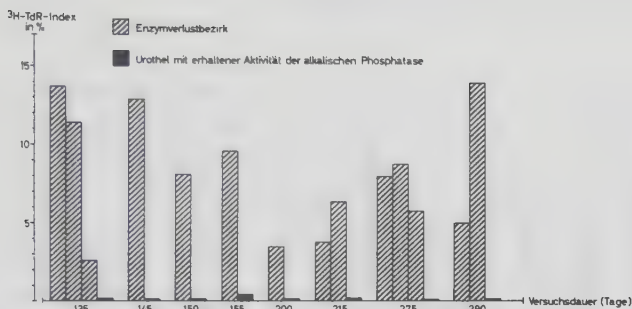


Abb. 8: ^3H -TdR-Index (%) in nicht hyperplastischen Urothelabschnitten mit Verlust der Aktivität der alkalischen Phosphatase, verglichen mit der umgebenden enzymhaltigen Schleimhaut.

In hyperplastischen Urothelabschnitten mit Ausfall der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase waren die suprabasalen Zellen noch stärker markiert als in den nicht hyperplastischen Enzymdefektbezirken. Bei der Auswertung der Papillome zeigte sich, daß der gleiche Tumor in der Regel eine stark unterschiedliche Markierung aufwies. Beim Vergleich der Autoradiogramme mit dem Aktivitätsverhalten der NADH-Diaphorase ergab sich, daß die Markierung in Bezirken, die durch eine Aktivitätsabschwächung des Enzyms charakterisiert waren, wesentlich höher war als vergleichsweise in den umgebenden, enzymhaltigen Papillomstrukturen. Die quantitative Auswertung ergab in den Tumorabschnitten mit Enzymverlust einen durchschnittlichen ^3H -TdR-Index von 20,5 % gegenüber 4,6 % in den enzymhaltigen Tumorarealen (Abb. 9). Die Differenz war hochsignifikant ($p < 0,001$; Student Test). Das die Papillome umgebende, enzymhaltige Urothel war mit 0,25 % nicht höher

markiert als das der Kontrolltiere.

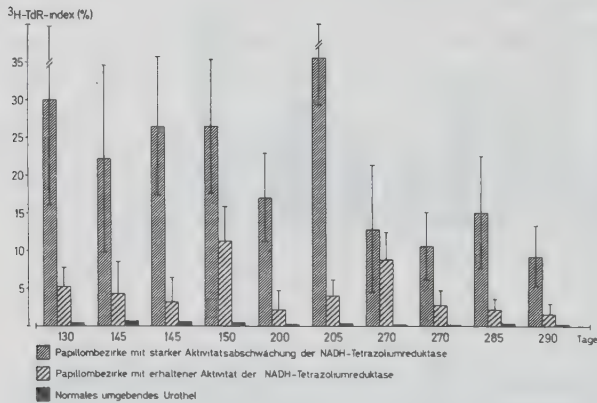


Abb. 9: ^3H -TdR-Index (%) (Mittelwerte mit Standardabweichung) in Papillomabschnitten mit stark abgeschwächter bzw. gut erhaltener Aktivität der NADH-Diaphorase. Zum Vergleich Werte des umgebenden, enzymhaltigen Urothels.

Plattenepithelpapillome und Areale von Transitionalzellpapillomen mit Plattenepithelmetaplasie zeigten fast immer einen hohen ^3H -TdR-Index.

Die Proliferationsaktivität der Carcinome war sehr unterschiedlich. Eine enge Beziehung zwischen Höhe des ^3H -TdR-Index einerseits und Differenzierungsgrad des Carcinoms andererseits konnte nicht nachgewiesen werden. Einige Transitionalzellcarcinome zeigten sogar einen niedrigeren Markierungsindex als Plattenepithelpapillome.

IV. DISKUSSION

Untersuchungen während der Entstehung von Harnblasentumoren an der Ratte (ITO et al. 1969; AKAGI et al. 1973) und Maus (BERTRAM und CRAY 1972; AKAGI et al. 1973) zeigten, daß nach Verabreichung von BBN als früheste morphologisch erkennbare Stufe der Tumorentwicklung umschriebene Hyperplasien auftreten. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß enzymhistochemisch noch vor Auftreten von Hyperplasien scharf umschriebene Urothelabschnitte mit Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase als früheste mikroskopisch erkennbare Stufe der Tumorentstehung nachweisbar sind. Ein analoger fokaler Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase wurde auch nach Verabreichung von Di-N-Butylnitrosamin (KUNZE und SCHAUER 1971; KUNZE, SPIELMANN und SCHAUER 1971) sowie nach Applikation des chemisch andersartig strukturierten Cancerogens N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl]Formamid (KUNZE, SCHAUER und KRÜSMANN 1975) beobachtet. STILLER und RAUSCHER (1971) berichteten über analoge Ergebnisse nach subkutaner Verabreichung von Di-N-Butylnitrosamin und Anwendung der Azo-Farbstoffmethode zum histochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase in der Harnblase. Über einen weitgehenden Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase in voll entwickelten Harnblasentumoren, induziert durch BBN und Di-N-Butylnitrosamin wurde durch ITO et al. (1973) berichtet. Ferner wurde kürzlich von HIGHMAN et al. (1975) eine verminderte Aktivität der alkalischen Phosphatase in hyperplastischen Urothelabschnitten und fehlende Enzymaktivität in Transitionalzellcarcinomen von Mäusen nach Applikation von 2-Acetylaminofluoren beschrieben. In menschlichen Harnblasentumoren wurde ebenfalls ein Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase gefunden (BURGHELE et al. 1965).

Der Ausfall der alkalischen Phosphatase ist nicht durch cytotoxische Wirkung des Cancerogens bedingt und irreversibel, wie sich aus den durchgeführten Absetzungsversuchen ergibt. So konnten 8 Monate nach Zufuhrstopp von BBN derartige Enzymausfallsbezirke gefunden werden. Analoge Befunde ergaben sich 10 Monate nach Absetzung von Di-N-Butylnitrosamin (KUNZE, SCHAUER und SPIELMANN 1971) sowie 4,5 Monate nach Absetzung von N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazoly]Formamid (KUNZE, SCHAUER und KRÜSMANN 1975). Der herdförmige Ausfall der alkalischen Phosphatase ist wahrscheinlich lange Zeit nach Absetzung des jeweiligen Cancerogens bzw. vor Tötung des Tieres aufgetreten, da sich sonst während des langen Zeitraumes zwischen Beendigung der Cancerogenzufuhr und Tötung des Tieres auf Grund der hohen und rasch einsetzenden Proliferationsaktivität aus den enzymnegativen Urothelabschnitten bereits Hyperplasien entwickelt hätten. Das bedeutet, daß die Transformation der normalen Urothelzelle bereits sehr früh stattgefunden haben muß, die Folge der Schädigung in Form des Enzymverlustes sich aber wesentlich später manifestierte. Die Ursache der langen Latenzzeit zwischen Transformation und Manifestation ist unbekannt. Bei der Entstehung von menschlichen Harnblasentumoren ist ebenfalls eine lange Latenzzeit bekannt (TEMKIN 1963).

Die enzymnegativen Urothelabschnitte sind als Vorläufer der Harnblasentumoren anzusehen. Dies ergibt sich auf Grund folgender Argumente:

1. Morphologisch kann ein lückenloser Übergang der Urothelabschnitte mit Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase über verschiedene Stadien der Hyperplasie bis zu den voll entwickelten Tumoren beobachtet werden.
2. Enzymhistochemisch weisen auch die Hyperplasien und die Tumoren einen weitgehenden Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase auf.

3. Autoradiographisch konnte in den Enzymausfallsherden stets ein hoher ^3H -TdR-Index ermittelt werden, während die Anzahl markierter Zellen im umgebenden Urothel im Vergleich zur normalen Schleimhaut nicht erhöht war.

Das Auftreten oft mehrerer Enzymdefektbezirke an verschiedenen, voneinander unabhängigen Stellen der gleichen Harnblase vor allem bei Tieren, denen das Cancero-gen längere Zeit appliziert worden war, spricht für eine multifokale Tumorentstehung in der Harnblase, wie sie auch für viele andere Cancerisierungsmodelle nachgewiesen wurde.

Das regelmäßige Auftreten eines herdförmigen, irreversiblen Enzymverlustes der alkalischen Phosphatase scheint für die Initialphase der Entwicklung experimentell induzierter Harnblasentumoren bei der Ratte charakteristisch zu sein, da die Schädigung dieses Enzyms auch nach Einwirkung chemisch unterschiedlich strukturierter Cancero-gene zu beobachten ist. Das tumorauslösende Prinzip der Nitrosamine und das N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl] Formamid beruht möglicherweise auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen. Die genaue Wirkungsweise der genannten Cancerogene ist nicht bekannt. Für das Di-N-Butylnitrosamin wurde eine Hydroxylierung zu N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin nachgewiesen. Diese Zwischenstufe wird zu Butyl-(3-Carboxypropyl)-Nitrosamin oxidiert (OKADA und SUZUKI 1972; HASHIMOTO, SUZUKI und OKADA 1972 und 1974; BLATTMANN und PREUSSMANN 1974). Der weitere Abbau führt wahrscheinlich zur Methylierung von Nucleinsäuren durch Bildung von Diazoalkanen und Carbonium-Ionen (KRÜGER 1971). Da im Rattenurin außer Methylguanin auch Propylguanin und Butylguanin gefunden wurde (KRÜGER 1971), wird als weiterer Abbaumechanismus des Di-N-Butylnitrosamins die *l*-c- oder *w*-I-Hydroxylierung mit direkter Übertragung von Alkylgruppen auf die Nucleinsäuren diskutiert (BLATTMANN und PREUSSMANN 1974).

Die Ursache des Enzymverlustes ist bisher noch nicht befriedigend zu erklären. Die Tatsache, daß der Ausfall der alkalischen Phosphatase lange Zeit nach Absetzen des Cancerogens eintritt und dann irreversibel bestehen bleibt, läßt auf eine durch das Cancerogen induzierte Schädigung von DNA-Molekülen mit nachfolgend veränderter Gen-Expression schließen. Ein weiterer Hinweis auf die Schädigung genetischen Materials besteht in der Beobachtung, daß der Ausfall der alkalischen Phosphatase stets total war und Zwischenstadien einer stufenweisen Abschwächung der Enzymaktivität nie gefunden werden konnten.

Die Deutung des histochemischen Verhaltens der NADH-Diaphorase während der Cancerogenese ist besonders schwierig, da dieses Enzym ein sehr uneinheitliches Reaktionsmuster zeigte. Nur etwa 2/3 der präneoplastischen Urothelabschnitte mit Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase zeigten eine Aktivitätsabschwächung der NADH-Diaphorase. In den voll entwickelten Tumoren war die Enzymaktivität meist nur herdförmig erniedrigt. Ferner konnten alle Abstufungen der enzymhistochemischen Aktivität und nur selten vollständige Aktivitätsausfälle gefunden werden. Außerdem beruht der histochemische Nachweis der "Diaphoraseaktivität" wahrscheinlich auf einer ganzen Reihe von Enzymen, welche außer der Lipoamiddehydrogenase (STRAUB 1939; SEIDLER 1973) noch weitgehend unbekannt sind. Das unregelmäßige Verhalten des Enzyms läßt darauf schließen, daß ihm nur eine sekundäre Rolle während der Cancerogenese zukommt.

Eines der wesentlichsten Argumente für die präneoplastische Natur der enzymnegativen Urothelabschnitte stellt die hohe Proliferationsaktivität in diesen Bezirken dar. Da keine Zellnekrosen feststellbar waren, kann die Zunahme der DNS-synthetisierenden Zellen nicht durch einen einfachen Zellersatz verursacht sein, sondern muß vielmehr auf

die Einwirkung des Cancerogens zurückgeführt werden. Die Proliferation scheint gleichzeitig mit dem Ausfall der alkalischen Phosphatase einzusetzen, da Defektbezirke ohne DNS-synthetisierende Zellen in der Regel nicht angetroffen wurden. Manche Autoren nehmen an, daß erst die Hyperplasie die Voraussetzung für die Tumorentwicklung in der Harnblase schafft, da die sich vermehrt teilenden Zellen in diesen Bezirken gegenüber der spezifischen Wirkung des Cancerogens empfindlicher seien als die ruhenden Zellen (CLAYSON et al. 1965; CLAYSON und PRINGLE 1966; CLAYSON et al. 1967). Nach den vorliegenden Untersuchungen muß aber die Hyperplasie bereits als fortgeschrittenes Stadium der Tumorentwicklung angesehen werden.

Der hohe ^3H -TdR-Index von 8,1 % in den enzymnegativen Urothelabschnitten läßt darauf schließen, daß die Entwicklung der Tumoren sehr rasch erfolgt. Nach Cancerisierung mit Di-N-Butylnitrosamin (KUNZE und SCHAUER 1971) betrug der ^3H -TdR-Index an entsprechenden Stellen 6,3 % und nach Verabreichung von N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl]Formamid 6,1 % (KUNZE, SCHAUER und KRÜSMANN 1975). Diese hohen Werte erscheinen zunächst erstaunlich, da die normale Harnblasenschleimhaut der Ratte zu den Geweben mit geringem Zellumsatz gerechnet werden muß, wie sich aus dem ermittelten ^3H -TdR-Index des Gesamturothels der Kontrolltiere von 0,26 ergibt. Ähnlich niedrige Werte wurden von anderen Autoren gefunden: 0,06 % (MIYAKAWA und YOSHIDA 1973), 0,12 % (SCHREIBER et al. 1969), 0,2 % (LOCHER und COOPER 1970) und 0,5 % (MESSIER und LEBLOND 1960). Andererseits ist dieser Befund verständlich, da eine starke Steigerung der Proliferationsaktivität des Urothels von Säugetieren nach unspezifischen Reizen seit langem bekannt ist. So kann eine rasch verlaufende Regeneration nach mechanischer Traumatisierung der Schleimhaut oder partieller Resektion der Blase beobachtet werden (Übersicht bei TUCCI und HARALAMBIDIS 1963; CLAYSON und

COOPER 1970; VAHLENSIEK 1971). Auch chemische Irritation mit 4-Äthylsulphonylnaphthalen-1-sulphonamid (LEVI et al. 1966) und Cyclophosphamid (KOSS 1967; LOCHER und COOPER 1970; CAMPOBASSO und BERRINO 1972) oder Röntgenbestrahlung (SCHREIBER et al. 1969) führt einen schnellen Anstieg des ^3H -TdR-Index herbei.

Der physiologische Regenerationsmodus ist in den enzymnegativen Urothelabschnitten verändert, da hier eine gesteigerte Proliferation der suprabasalen Zellen festzustellen ist. Noch ausgeprägter manifestiert sich dieses Phänomen in den hyperplastischen Urothelabschnitten, in denen in der Regel die größere Anzahl markierter Zellen nicht basal, sondern in den darüber gelegenen Zellschichten zu finden ist. Für die Cancerogenese erscheint dieser Prozeß jedoch nicht spezifisch, da eine erhöhte Proliferationsaktivität in den suprabasalen Zellen auch nach verschiedenen unspezifischen Reizen festgestellt werden kann.

Die hohe Proliferationsaktivität in Papillombezirken, welche außer einem Verlust der alkalischen Phosphatase auch eine starke Aktivitätsabschwächung der NADH-Diaphorase zeigten, läßt sich nicht befriedigend erklären. Da die NADH-Diaphorase nur in Tumoren mit Plattenepithelmetaplasie ein einheitliches Reaktionsmuster zeigte und die Proliferationsaktivität in diesen Tumoren meist sehr hoch lag, liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den Tumorabschnitten mit starker Aktivitätsabschwächung der NADH-Diaphorase um beginnende, morphologisch meist noch nicht sichtbare Plattenepithelmetaplasien handelt.

Eine enge Korrelation zwischen Differenzierungsgrad des Carcinoms und Höhe des ^3H -TdR-Index, wie sie an in-vitro mit 6- ^3H -Thymidin markiertem menschlichen Untersuchungsmaterial und an experimentell mit 2-N-Azetylamino fluoreszenz induzierten Harnblasentumoren der Ratte gefunden wurde

(BATTIFORA et al. 1965; VEENEMA, FINGERHUT und LATTIMER 1965), konnte in vorliegender Untersuchung nicht festgestellt werden. Auch andere Autoren (LUNGLMAYR und REGELE 1969; LEVI et al. 1969) fanden bei der Untersuchung menschlicher Harnblasentumoren keinen derartigen Zusammenhang.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Entwicklung von Harnblasentumoren bei 38 weiblichen und männlichen Sprague-Dawley Ratten nach oraler Applikation von N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin mit enzymhistochemischen und autoradiographischen Methoden unter besonderer Berücksichtigung von Frühveränderungen untersucht. Zum Ausschluß toxischer Einflüsse wurden die Ratten bis zu 240 Tage von der Cancerogenzufuhr abgesetzt.

Enzymhistochemisch konnte als erste lichtmikroskopisch erkennbare Veränderung der Cancerogenese ein herdförmiger, scharf begrenzter, irreversibler Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase an histologisch und cytologisch normal erscheinendem Urothel nachgewiesen werden. In etwa 2/3 der Fälle war in identischen Bezirken die Aktivität der NADH-Diaphorase unterschiedlich stark abgeschwächt. Die enzymnegativen Urothelabschnitte sind als präneoplastisch anzusehen, da sich aus ihnen über verschiedene Stadien der Hyperplasie Papillome und Carcinome entwickeln, die in der Regel ebenfalls durch einen weitgehenden Verlust der alkalischen Phosphatase ausgezeichnet waren. Die NADH-Diaphorase zeigte in den Papillomen und Carcinomen meist nur herdförmig einen unterschiedlich stark ausgeprägten Aktivitätsverlust.

Da der Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase übereinstimmend nach Applikation chemisch verschieden strukturierter Cancerogene auftritt, scheint er charakteristisch für die Initialphase der Tumorentstehung in der Harnblase zu sein.

Autoradiographisch ergab sich in den Enzymdefektbezirken eine Steigerung des 6-³H-Thymidinmarkierungsindex um durchschnittlich das 43-fache im Vergleich zu dem umgebenden enzymhaltigen Urothel. Dieses zeigte, verglichen mit dem Urothel von Kontrolltieren, keine signifikante Änderung des ³H-TdR-Indexes. Der physiologische Regenerationsmodus war in den Enzymdefektbezirken nicht aufrecht erhalten, da neben den Basalzellen in verstärktem Ausmaß auch die suprabasalen Zellen proliferierten. Areale von Papillomen, welche eine starke Aktivitätsabschwächung der NADH-Diaphorase aufwiesen, zeigten einen um das 4,5-fache 6-³H-Thymidinmarkierungsindex als die umgebenden Tumorbezirke mit erhaltener Enzymaktivität.

Das angewandte Cancerisierungsmodell erscheint für die Gewinnung von Erkenntnissen über den Entwicklungsablauf bei der Tumorentstehung in der menschlichen Harnblase als besonders geeignet.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) AKAGI, G., AKAGI, A., KIMURA, M., OTSUKA, H.: Comparison of bladder tumors induced in rats and mice with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine
Gann 64, 331 (1973)

- (2) AMON, H., PETRY, G.: Fermenthistochemische Untersuchungen am Übergangsepithel verschiedener Säugtiere
Experimenta 18, 442 (1962)

- (3) BATTIFORA, H.A., EISENSTEIN, R., SKY-PECK, H.H., MC DONALD, J.H.: Electron microscopy and tritiated thymidine in graduation of malignancy of human bladder carcinomas
J. Urol. (Baltimore) 93, 217 (1965)

- (4) BERTRAM, J.S., CRAIG, A.W.: Specific induction of bladder cancer in mice by butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and the effects of hormonal modifications on the sex difference in response
Europ. J. Cancer 8, 587 (1972)

- (5) BLATTMANN, L., PREUSSMANN, R.: Biotransformation von carcinogenen Dialkylnitrosaminen. Weitere Urin-metabolite von Di-n-butyl- und Di-n-phenyl-nitrosamin
Krebsforsch. 81, 75 (1974)

- (6) BURGHELE, TH., MARUS, V., VIAD, C., VULCAN, R.: Contribution à l'etude histochemique des tumeurs de la vessie
Urol. int. 20, 42 (1965)

- (7) CAMPOBASSO, C., BERRINI, F.: Early effects of cyclophosphamide on mouse bladder epithelium
Path. Microbiol. 38, 144 (1972)

- (8) CLAYSON, D.B., LAWSON, T.A., SANTANA, S., BONSER, G.M.: Correlation between the chemical induction of hyperplasia and of malignancy in the bladder epithelium
Brit. J. of Cancer 19, 297 (1965)

- (9) CLAYSON, D.B., PRINGLE, J.A.S.: The influence of a foreign body on the induction of tumours in the bladder epithelium of the mouse
Brit. J. of Cancer 20, 564 (1966)

- (10) CLAYSON, D.B., PRINGLE, J.A.S., BONSER, G.M.: 4-ethylsulphonylnaphthalene-1-sulphonamide: A new chemical for the study of bladder cancer in the mouse
Biochem. pharmacol. 16, 619 (1967)

- (11) CLAYSON, D.B., COOPER, E.H.: Cancer of the urinary tract
Advances in Cancer Res. 13, 271 (1970)

- (12) DRUCKREY, H. IVANKOVIC, S., SCHMIDT, C.H., MENNEL, H.D., STAHL, K.W.: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-Butyl-N-Butanol-(4)-nitrosamin
Z. Krebsforsch. 66, 280 (1964)

- (13) GOMORI, G.: The distribution of phosphatase in normal organs and tissues
J. cell comp. Physiol. 17, 71 (1941)

- (14) HASHIMOTO, Y., SUZUKI, E., OKADA, M.: Induction of urinary bladder tumors in ACI/N rats by Butyl-(3-carboxylpropyl)nitrosamine, a major urinary metabolite of Butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
Gann 43, 637 (1972)

- (15) HASHIMOTO, Y., SUZUKI, K., OKADA, M.: Induction of urinary bladder tumors by intravesicular instillation of Butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine and its principal urinary metabolite, Butyl-(3-carboxylpropyl)nitrosamine in rats
Gann 65, 69 (1974)

- (16) HICKS, R.M.: The function of the Golgi complex in transitional epithelium. Synthesis of the thick cell membran
J. Cell. Biol. 30, 623 (1966)

- (17) HIGHMAN, B., FRITH, C.F., LITTLEFIELD, N.A.: Alkaline phosphatase activity in hyperplastic and neoplastic urinary bladder epithelium of mice fed 2-acetylaminofluorene
J. of the Nat. Cancer Inst. Vol. 54, No. 1, 257 (1975)

- (18) ITO, N., HIASA, Y., TAMAI, A., OKAJIMA, E., KITAMURA, H.: Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine in rats
Gann 60, 401 (1969)

- (19) ITO, N.: Experimental studies on tumors of the urinary system of rats induced by chemical carcinogens
Acta path. jap. 23, 87 (1973)

- (20) KOSS, L.G.: The asymmetric unit membrane of the epithelium of the urinary bladder of the rat. An electron microscopic study of a mechanism of epithelial maturation and function
Lab. Invest. 21, 154 (1969)
- (21) KRÜGER, F.W.: Metabolismus von Nitrosaminen in vivo. I. Über die β -Oxidation aliphatischer Di-n-alkylnitrosamine: Die Bildung von 7-Methylguanin nach Applikation von Di-n-propyl- oder Di-n-butylnitrosaminen
Z. Krebsforsch. 76, 145 (1971)
- (22) KUNZE, E., SCHAUER, A., CALVOER, R.: Zur Histochemie von Harnblasenpapillomen der Ratte induziert durch Dibutylnitrosamin
Naturwiss. 56, 639 (1969)
- (23) KUNZE, E., SCHAUER, A.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen an Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasenpapillomen der Ratte
Z. Krebsforsch. 75, 146 (1971)
- (24) KUNZE, E., SCHAUER, A., SPIELMANN, J.: Autoradiographische Untersuchungen über den RNS-Stoffwechsel während der Entwicklung von Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasentumoren der Ratte
Z. Krebsforsch. 76, 236 (1971)
- (25) KUNZE, E., SCHAUER, A., KRÜSMANN, G.: Focal Loss of Alkaline Phosphatase and Increase of Proliferation in Preneoplastic Areas of the Rat Urothelium after Administration of N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamine and N-4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl Formamide
Z. Krebsforsch. 84, 143 (1975)

- (26) LEVI, P.E., COWEN, D.M., COOPER, E.H.: Induction of cell proliferation in the mouse bladder by 4-ethylsulfonylnaphthalene-1-sulfonamide
Cell Tissue Kinet. 2, 249 (1969)

- (27) LOCHER, G.W., COOPER, E.H.: Repair of urinary bladder epithelium following injury by cyclophosphamide
Invest. Urol. 8, 116 (1970)

- (28) LUNGLMAYR, G., REGELE, H.: Autoradiographische Untersuchungen zur Proliferation von papillären Tumoren der Harnblase
Urologe 8, 67 (1969)

- (29) MARTIN, B.F.: Histological and histochemical studies on the bladder and ureter, with particular reference to alkaline phosphatase and golgi material
The J. of Anat. (London) 92, 268 (1958)

- (30) MIYAKAWA, M., YOSHIDA, O.: DNA synthesis of the urinary bladder epithelium in rats with long-term feeding dl-tryptophan added and pyridoxine-deficient diet
Gann 64, 411 (1973)

- (31) MENDE, T.J., CHAMBERS, E.L.: Distribution of mucopolysaccharide and alkaline phosphatase in transitional epithelia
J. Histochem. cytochem. 5, 99 (1957)

- (32) OKADA, M., SUZUKI, E.: Metabolism of butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine in rats
Gann 53, 391 (1972)

- (33) PEARSE, A.G.E.: Histochemistry
ed. by Churchill Livingstone, Edingburgh and London, vol. 2 (1972)

- (34) PETRY, G., AMON, H.: Licht- und elektronenoptische Studien über Struktur und Dynamik des Übergangsepithels
Z. Zellforsch. 69, 587 (1966)
- (35) PETRY, G., AMON, H.: Die funktionelle Struktur des Harnblasenepithels und ihre Bedeutung für die urologische Cytodiagnostik
Klin Wschr. 44, 1371 (1966)
- (36) REGELE, H., LUNGLMAYR, G.: Zur Wachstumsdynamik des Übergangsepithels
Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 2, 229 (1969)
- (37) SCARPELLI, D.G., HESS, R., PEARSE, A.G.E.: The cytochemical lokalisation of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase
J. biophys. biochem. Cytol. 4, 747 (1958)
- (38) SCHREIBER, J., OEHLERT, W., KUGLER, K.: Regeneration und Proliferationskinetik des normalen und strahlengeschädigten Urothels der Ratte
Virchows Archiv Abt. B. Zellpath. 4, 30 (1969)
- (39) SEIDLER, E.: Charakterisierung der NADH_2 -Lipoamid-Dehydrogenase als Tetrazolium-reduktase
Acta histochem. 47, 30 (1973)
- (40) STILLER, D., RAUSCHER, H.: Irreversible preneoplastic defect in alkaline phosphatase in cancerization of transitional epithelium
Exp. Path. 5, 255 (1971)

- (41) STRAUB, F.B.: On the reoxidation of diaphorase flavoprotein
Enzymologia 9, 148 (1939)

- (42) STUTTE, H.J.: Hexazotiertes Triamino-Tritolyl-Methanchlorid (Neufuchsin) als Kupplungssalz in der Fermenthistochemie
Histochemie 8, 327 (1967)

- (43) TEMKIN, J.S.: Industrial bladder carcinogenesis
ed. by Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris (1963)

- (44) VEENEMA, R.J., FINGERHUT, B., LATTIMER, J.K.:
Experimental studies on the biological potential of bladder Tumors
J. Urol. (Baltimore) 93, 202 (1965)

- (45) VEENEMA, R.J., FINGERHUT, B., GRAFF, S.: Nucleic acid synthesis in bladder tumours
Transactions of the American Association of Genito-Urinary surgeons 62, 155 (1970)

- (46) WALKER, B.E.: Radiographic observations on regeneration of transitional epithelium
Tex. Rep. Biol. Med. 17, 375 (1959)

- (47) WALKER, B.E.: Electron microscopic observations on transitional epithelium of the mouse urinary bladder
J. Ultrastruct. Res. 3, 345 (1960)

Herrn Prof. Dr. A. Schauer gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und das Interesse, das er dem Fortgang der Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Dr. E. Kunze, Frau R. Polt, Frau R. Schwaiger und Frl. H. Vondracek danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51) und der Curt-Bohnewand-Stiftung, München, unterstützt.

LEBENS LAUF

Am 2. April 1947 wurde ich, Gottfried Krüsmann, als Sohn des Frauenfacharztes Dr. Wilhelm Krüsmann und seiner Ehefrau Ilse, geb. Falch, in München geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Gräfelfing bei München. 1957 trat ich in das neusprachliche Kurt-Huber-Gymnasium in Gräfelfing ein, wo ich 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im Oktober 1967 das Vorphysikum, im September 1969 das Physikum und im Dezember 1972 das medizinische Staatsexamen bestand.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich von Januar bis April 1973 in der Frauenklinik Dr. Krüsmann in München-Pasing und von Mai 1973 bis Februar 1974 im Kreis-krankenhaus München-Pasing. Im März 1974 erlangte ich die Approbation als Arzt. Von März bis Mai 1974 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Frauenklinik Dr. Krüsmann in München-Pasing. Von Juni 1974 bis August 1975 leistete ich meinen Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.

Seit September 1975 arbeite ich in der Frauenklinik Dr. Krüsmann in München-Pasing als Assistenzarzt zur gynäkologischen Facharztausbildung.

